Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE BESTIMMUNG DER GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE IN EINEM VOLLMECHANISIERTEN ANALYSENSYSTEM

EIN BEITRAG FÜR DAS LABORDIAGNOSTISCHE SUCHPROGRAMM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt
von
Karl Friedrich Baur
aus
Friedrichshafen

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0015

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE BESTIMMUNG DER GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE IN EINEM VOLLMECHANISIERTEN ANALYSENSYSTEM

EIN BEITRAG FÜR DAS LABORDIAGNOSTISCHE SUCHPROGRAMM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt
von
Karl Friedrich Baur
aus
Friedrichshafen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. N. Schwenzer
Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein

FOTODRUCK H. RESCH · Georgstr. 50 · 7402 Kirchentellinsfurt

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODE	3
2.1	Gerät	3
2.2	Prinzip	3
2.2.1.	Manuelle Methode	4
2.2.2.	Automatische Methode	5
2.2.2.1.	Fluß-Schema am SMA 12/60	5
2.2.2.2.	Material	6
2.2.2.3.	Serumproben	6
2.2.2.4.	Hämolyse	7
2.2.2.5.	Stabilität des Enzyms in der Probe	7
2.2.2.6.	Auf die Zeit bezogene Linearität der Reaktion	8
2.2.2.7.	pH-Wert des Reaktionsmilieus	9
2.2.2.8.	Temperatur	10
2.2.2.9.	Absorptionsmaximum	13
2.2.2.10.	Leitungsmaterial	13
2.2.2.11.	Netzmittel	14
2.2.2.12.	Verhältnis Reagenz-Serum	21
2.2.2.13.	Identität der beiden Kanäle	25
3.	ERGEBNISSE	26
4.	DISKUSSION	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	36
6.	LITERATURVERZEICHNIS	37

1. EINLEITUNG

Die Gamma-Glutamyltransferase (GT), (früher Gamma-Glutamyltranspeptidase), wurde 1950 von HANES et al. entdeckt und beschrieben (8). Sie katalysiert die Übertragung von, über die Aminogruppe an der Säureamidbindung beteiligter, endständiger Glutamylreste verschiedener Peptide auf Aminosäuren oder andere Peptide, wobei andere Gamma-Glutamyl-Peptide entstehen (9).

Hohe GT-Konzentrationen finden sich in der Niere, weniger hohe in Leber, Milz und Pankreas (5, 8).

Später beschrieben SZEWCZUK et al., daß die Funktion der GT auf einer hydrolytischen und transpeptidierenden Einwirkung auf Gamma-Glutamylreste beruht (20).

In der klinisch-chemischen Diagnostik gilt die GT, wie die alkalische Phosphatase (AP) und Leucinaminopeptidase (LAP) als ein Enzym, das hauptsächlich bei cholestatischen Prozessen im Serum erhöht ist (1, 11). Außerdem findet man erhebliche Anstiege bei Leberparenchymschäden. Dabei zeichnet sich die GT durch eine besonders hohe Empfindlichkeit im Vergleich mit den Transaminasen GOT und GPT aus (9).

SZASZ et al. (15) untersuchten 1007 Seren von 267 Patienten mit "hepatobiliären Erkrankungen". Sie bestimmten die GT, AP und LAP. Die Aktivität der GT war in 93 % der Fälle erhöht, die der AP und LAP lediglich in 62 % bzw. 67 %. Bei 44 % der Fälle lag die Aktivität der GT über dem fünffachen der Norm, bei der AP und LAP war dies ein seltener Befund.

KOKOT et al (9) untersuchten an 50 Patienten das Verhalten der GT bei Virus-Hepatitis. Sie fanden, daß die mittlere GT-Aktivität im Gegensatz zu den Transaminasen bis zur sechsten Krankheitswoche praktisch unverändert bleibt. Ab der siebten Woche fällt die GT-Aktivität langsam ab, und es finden sich in der zwölften Woche noch zwei- bis fünffach erhöhte Werte.

KOMMERELL et al. (10) und VILLA et al. (21) heben den Wert der GT für Verlaufsbeobachtungen von chronischen Hepatitiden hervor. Zum selben Schluß kam DELBRUCK (2), der darauf hinweist, daß bei Leberzirrhosen mit GT-Werten, höher als das 20-fache der Norm, immer an ein primäres Leberkarzinom oder an Lebermetastasen zu denken sei. Siehe auch GIBINSKI et al. (4) und SZCZEKLIK et al. (19).

SZASZ et al. (15) fanden unter anderem bei Fettleber (18 Fälle) bis zum zweifachen der Norm erhöhte GT-Werte, bei 10 dieser Patienten war die Aktivität der anderen Enzyme normal, die restlichen 8 zeigten leicht erhöhte Transaminasen (24 IE).

Die GT ist somit ein Enzym, das sowohl in der Differentialdiagnostik als auch bei Verlaufskontrollen Anwendung findet (11, 14, 23). Außerdem bietet sich die GT-Bestimmung aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Enzyms als Screening-Test auf hepatobiliäre Erkrankungen an (1, 3, 9, 14).

2. METHODE

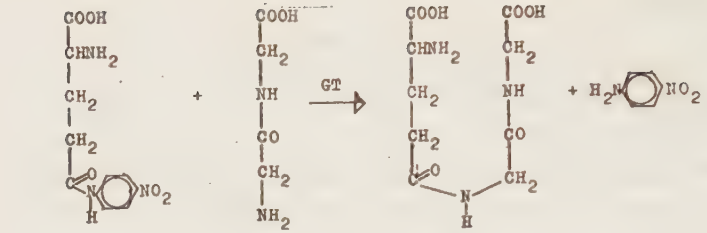
2.1. Gerät

Der Autoanalyzer SMA 12/60 (Fa. Technicon) eignet sich als Analysengerät für Screening-Untersuchungen, weil bei ihm gleichzeitig 12 verschiedene Laboruntersuchungen bei geringstem personellen und zeitlichen Aufwand durchgeführt werden können. Der SMA 12/60 liefert pro Stunde von 40 bis 45 verschiedenen Seren (einschließlich Testseren und Standardlösungen) je zwölf diagnostische Parameter. Eine Adaption der Bestimmungsmethode für die GT auf ein vollmechanisches Analysensystem ist auch aufgrund der zunehmenden Verbreitung des Enzyms in klinisch diagnostischen Bereich notwendig. Gegenüber einer manuellen Methode werden dadurch Verwechslungen und Pipettierfehler reduziert und die Präzision erhöht.

2.2. Prinzip

Die von NAFTALIN et al. (12) angegebene, von EGGSTEIN et al. (3) modifizierte manuelle Methode wurde für die Adaption auf das mechanische Analysenmeßgerät im Prinzip übernommen. Bei der manuellen Methode handelt es sich um ein kontinuierliches Verfahren mit fortlaufender Registrierung der enzymatischen Reaktion, bei der automatischen Methode um ein diskontinuierliches Verfahren, mit Registrierung der Reaktion nach bestimmtem Reaktionszeitablauf.

Folgende Reaktion wird durch das Enzym GT in meßbare Zeitintervalle gerückt:



Gamma-Glutamyl-para-Nitroanilid | Glycylglycin | Gamma-Glutamyl-Glycylglycid | para-Nitroanilin

Abbildung 1:

Die GT-katalysierte Reaktion setzt unmittelbar photometrisch meßbares p-Nitroanilin frei

Gemessen wird bei beiden Methoden das anfallende para-Nitroanilin. Im sichtbaren Bereich ist das Substrat Gamma-Glutamyl-para-Nitroanilid ungefärbt, während das Produkt der enzymatischen Reaktion das para-Nitroanilin gelb gefärbt ist. Gemessen wird die Extinktionszunahme bei 405 nm. Das Absorptionsmaximum für para-Nitroanilin liegt zwischen 350 und 430 nm (13).

2.2.1. Manuelle Methode

Bei der manuellen Methode wird mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten gemessen.

1 ml Serum und 0,05 Reagenzienlösung (Gamma-Glutamyl-para-Nitroanilid und Glycyglycin) werden zusammengegeben und das anfallende para-Nitroanilin bei 405 nm gemessen.

2.2.2. Automatische Methode

Die Methode mit kontinuierlichem Flußsystem, z.B. SMA 12/60, ist auf Relativmessungen angewiesen. Das Gerät wird empirisch geeicht, die Analysenwerte beziehen sich auf den Sollwert des Eichstandards.

2.2.2.1. Fluß-Schema am SMA 12/60 (siehe Abbildung 2)

Küvetten: 2,0 Durchmesser
Filter: Max 405-410 nm
Fotozellen: 199-B021-O"
Heizbäder: G-Coil 37C
Schläuche:

gelb-gelb	0,056 inches	=	1,20 ml/min Förderleistung
orange-weiß	0,025 inches	=	0,23 ml/min Förderleistung
orange-grün	0,015 inches	=	0,10 ml/min Förderleistung
rot-rot	0,045 inches	=	0,80 ml/min Förderleistung

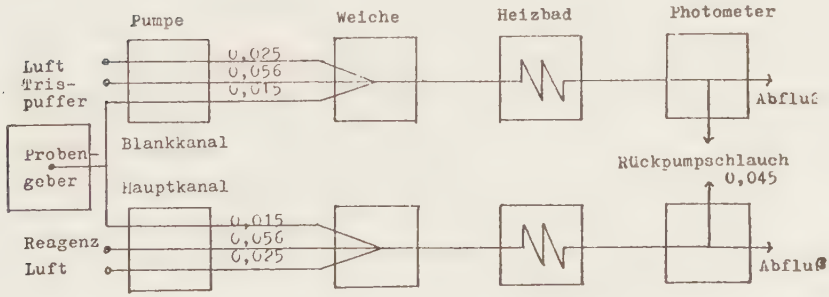


Abbildung 2:
Fluß-Schema am SMA 12/60 für die Bestimmung der Gamma-GT; die Zahlen bedeuten die Förderleistungen der Schläuche in ml/min

2.2.2.2. Material

Reagentien

a. Tris (hydroxymethyl)-aminomethan MG 121, 14
   Merck Nr. 8382
b. 1N HCl
c. Glycylglycin MG 132, 12 Merck Nr. 4233
d. L-Gamma glutamyl-p-nitroanilid MG 276, O Boehringer
   Mannheim Bestell-Nr. 150 000
e. Triton X-405 Fa. Serva Heidelberg
f. Natriumacid MG 65,O Merck Nr. 6688

Lösungen

a. Tris-Puffer (O,1M, pH 8,25)
   12,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan werden in 800 ml Aqua demin. gelöst, mit 1N HCl wird auf pH 8,25 eingestellt und mit Aqua demin. auf 1000 ml aufgefüllt.
b. Puffer-Substrat-Lösung
   In 100 ml Tris-Puffer werden 7 g Glycylglycin gelöst, 1 g L-Gamma-glutamyl-p-nitroanilid unter Erwärmung auf 50° C zugegeben. Nach vollständiger Lösung wird sofort auf 25° C abgekühlt und 1 g Na-Acid beigefügt.

Lösung a und b werden für den Gebrauch am SMA 12/60 4 ml Netzmittel Triton X-405 pro 1000 ml Lösung zugegeben.

Die Puffer-Substrat-Lösung ist bei 25° C und bei abgedunkeltem Aufbewahrungsort etwa fünf Tage haltbar (16, 17).

2.2.2.3. Serumproben

Für die Methode werden etwa 2 ml für eine 12-fach Analyse benötigt. Wie für alle Bestimmungen im kontinuierlichen Meßsystem des SMA 12/60 darf das Serum keine Gerinnsel enthalten, die die Gefahr der Verstopfung des System in sich bergen.

Das ohne Zusatz gewonnene Venenblut muß nach vollständiger Gerinnung (etwa ca. 1 Stunde nach Blutabnahme) 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert werden.

2.2.2.4. Hämolyse

Hb-Werte bis zu 500 mg% beeinflussen die Ergebnisse nicht, da die GT in Erythrozyten nicht anwesend ist (9, 16) und die Messung bei 405 nm erfolgt.

2.2.2.5. Stabilität des Enzyms in der Probe

Nach SZASZ (16) und GOLDBARG et al. (5) ist das Enzym im menschlichen Serum zwischen -20° C und $+20^{\circ}$ C mindestens eine Woche stabil. Wir können die Ergebnisse von ARONSON et al. (1) bestätigen, der innerhalb zwei Wochen keine Enzym-Aktivitätsminderung bei einer Aufbewahrungstemperatur von 4° C für Seren fand.

2.2.2.6. Auf die Zeit bezogene Linearität der Reaktion

Die Enzymreaktion, wie sie auch am SMA 12/60 gemessen wird, wurde bei verschiedenen Aktivitäten mit dem Photometer (Fa. Eppendorf) jeweils über 40 Minuten kontinuierlich registriert. Über diesen Zeitraum verläuft die Reaktion linear, was andere Autoren bestätigen (6, 7, 13).

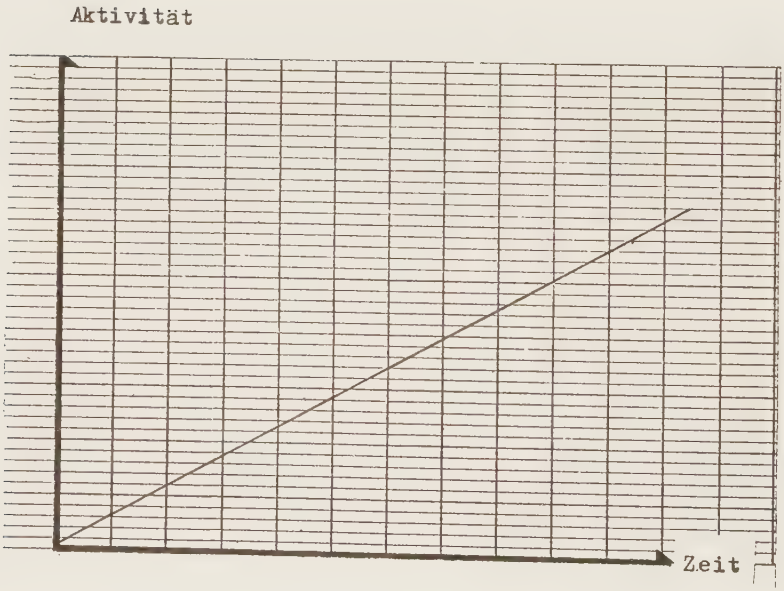


Abbildung 3:

Kontinuierliche Registrierung der Reaktion über 40 Minuten mit einem Eppendorf-Photometer. Filter 405 nm, Papiergeschwindigkeit 0,6 cm/min

2.2.2.7. pH-Wert des Reaktionsmilieus

Wir stellten den pH-Wert der Reagenzlösung auf 8,25 ein, entsprechend der manuellen Routinemethode.

SZASZ et al. geben als pH-Optimum Werte um 8,2 an (16). Bei HAESEN et al. liegen die Werte zwischen 8,0 und 8,4 (7).

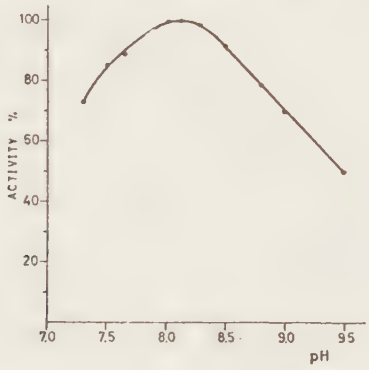


Abbildung 4:

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymreaktion, in Prozent des Maximums ausgedrückt, nach HAESEN et al.

2.2.2.8. Temperatur

Als Optimum gibt SZASZ für diese Reaktion Temperaturen um 42° C an, gleichzeitig setzt aber bei diesen Temperaturen eine erhebliche spontane Hydrolyse des Substrats ein (16).

HAESEN et al. geben als Temperaturoptimum Werte zwischen 35°C und 45° C an (7).

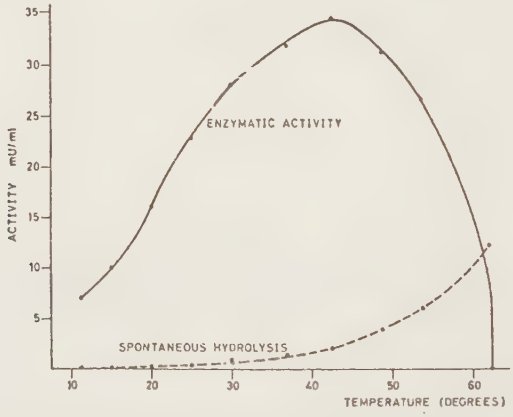


Abbildung 5:

Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität und der spontanen Hydrolyse von der Temperatur nach SZASZ

Die manuelle Methode wird bei 25° C durchgeführt. Die Reaktion am SMA 12/60 erreicht bei 37° C (siehe Abbildung 6 und 7) eine noch bessere Übereinstimmung mit der manuellen Methode. Eine nennenswerte spontane Hydrolyse trat nicht auf. Die statistische Auswertung der Ergebnisse von Abbildung 6 und 7 ergibt für die Reaktion bei 37° C eine

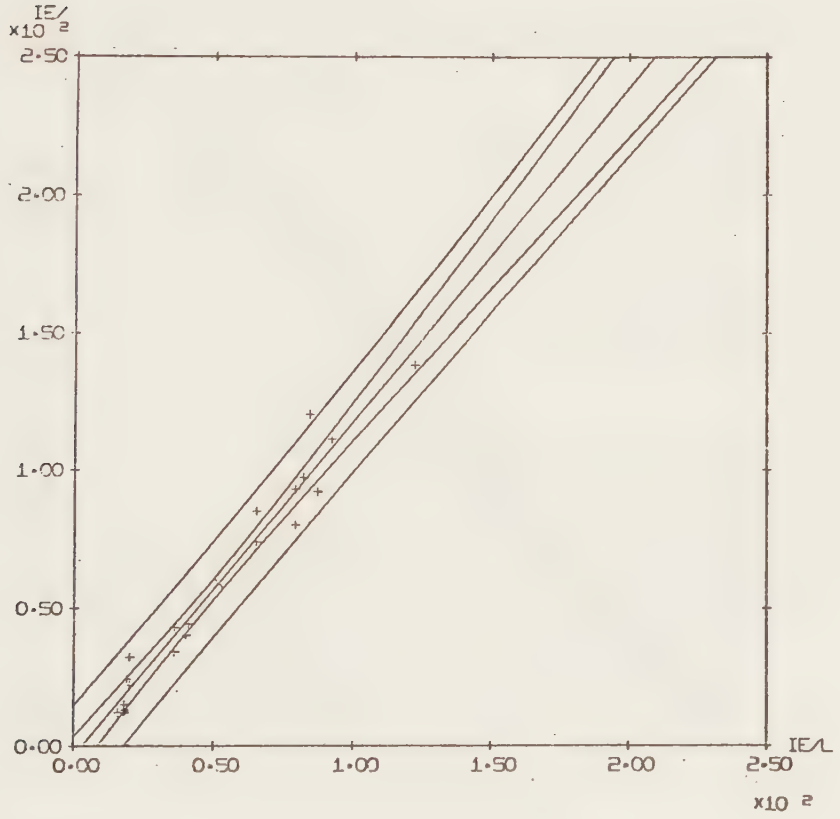


Abbildung 6:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 22° C,
Serum-Reagenz-Verhältnis 0,1:2,0
N=20, Y=A+BX, A=4,0, B=1,2+-0,06, R=0,98+-0,05

signifikant bessere Korrelation zwischen der manuellen Methode und der vollmechanisierten Methode. Der Korrelationskoeffizient beträgt bei 37° C 0,99 ± 0,02 gegenüber 0,98 ± 0,05 bei 32° C.

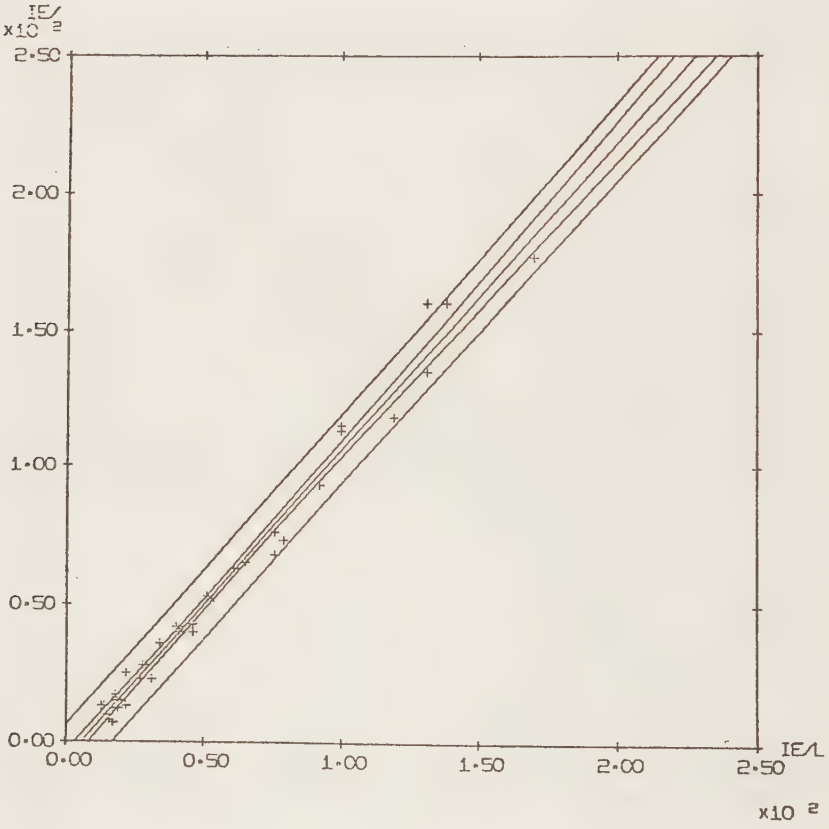


Abbildung 7:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Serum-Reagenz-Verhältnis 0,1:2,0
N=39, Y=A+BX, A=-6,4, B=1,1+-0,02, R=0,99+-0,02

Bei 37° C verläuft die enzymatische Reaktion rascher als bei 25° C, vermutlich wird die Präzision der Methode dadurch besser (Abbildungen 6 und 7). Dieser Gesichtspunkt ist für ein kontinuierliches Meßverfahren besonders wichtig. Für die internationale Enzymeinheit sind 25° C Meßtemperatur festgelegt worden. Da der SMA 12/60 mit einem Standard geeicht wird, kann man unmittelbar mit IE/l arbeiten, obwohl man bei 37° C mißt.

2.2.2.9. Absorptionsmaximum

Für die Untersuchungen am SMA 12/60 verwendeten wir Filter 405 nm. Nach ORLOWSKI et al. (13) zeigt das p-Nitroanilin die höchste Absorption zwischen 350 und 420 nm. SZASZ (16) gibt für die manuelle Methode 405 nm an.

2.2.2.10. Leitungsmaterial

Vorversuche veranlaßten uns, sämtliche Schläuche, soweit möglich, am System durch Glas zu ersetzen, da immer wieder Plateauverformungen (siehe Abbildung 8) und dadurch bedingte abnorme Werte auftraten. Nach hohen Werten wurden niedrige falsch hoch gemessen oder ein relativ hoher Reagentienleerwert beobachtet. Der unruhige Plateauverlauf wird durch eine hohe Adhäsion zwischen p-Nitroanilin und dem synthetischen Schlauchmaterial verursacht. Siehe auch HAESEN et al. (7).

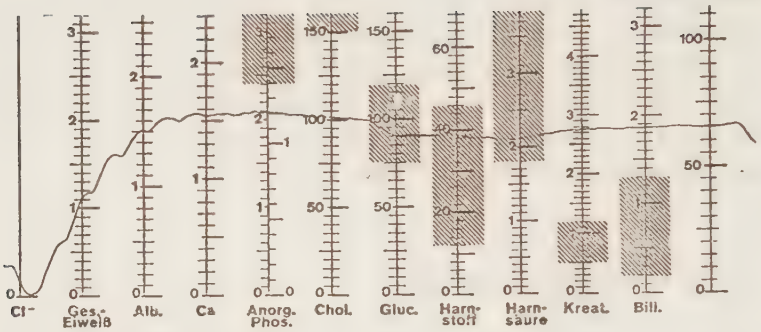


Abbildung 8:

Plateauverformungen, bedingt durch Kunststoffschläuche, das Netzmittel ist Triton X-405;
die Dauer der Plateaubildung beträgt 60 Sekunden

2.2.2.11. Netzmittel

Anfängliche Schwierigkeiten, ein optimales und konstantes Absorptionsplateau mit guter Korrelation zur manuellen Bestimmung zu erreichen, führten wir auf ungeeignete Netzmittel zurück. Bei der Suche nach dem geeigneten Netzmittel erprobten wir insgesamt sieben verschiedene Lösungsvermittler.

Getestet wurden:
Triton X-405, Triton X-100, Octanol, Wetting Agent, ARW 7, Ultrawet und FC 134.

Es wurden jeweils die GT-Werte in 10 bis 30 Seren mit der manuellen Methode und der vollmechanisierten Methode verglichen. Abbildung 9 zeigt die enge Korrelation beider Verfahren ($r=0{,}992 \pm 0{,}02$) bei Verwendung des Detergens

Triton X-405. Es weist auch eine ideale Plateaubildung auf (siehe Abbildung 12). Das Netzmittel ARW-7 ist sowohl hinsichtlich der Korrelation als auch der Plateauverformung völlig ungeeignet (siehe Abbildung 10).

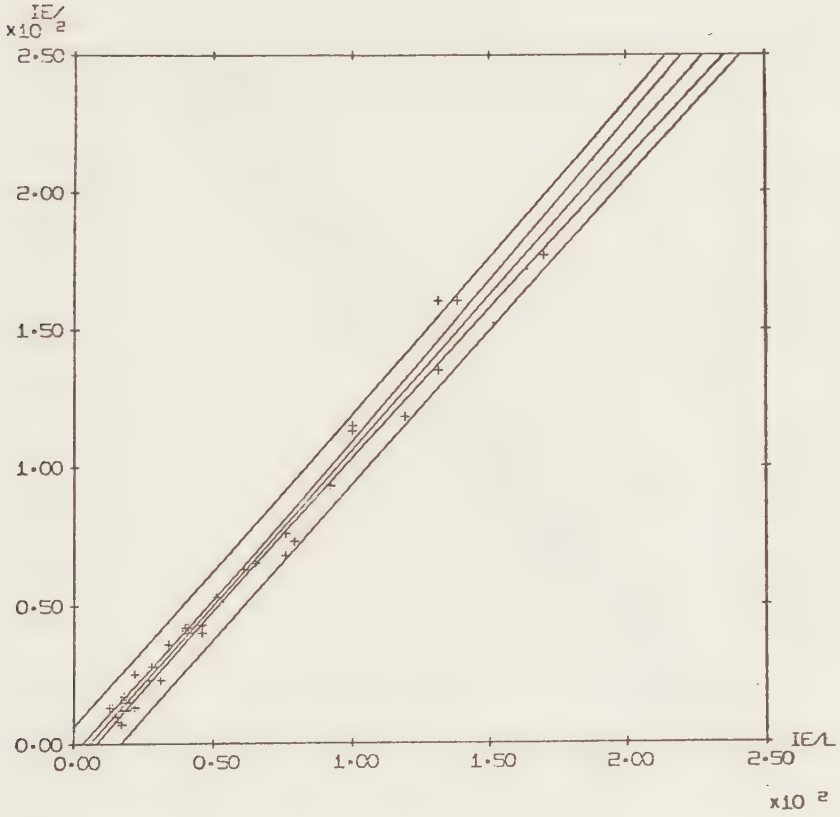


Abbildung 9:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Serum-Reagenz-Verhältnis 0,1:2,0,
Netzmittel Triton X-405
N=39, Y=A+BX, A=-6,4, B=1,1+-0,01, R=0,992+-0,02

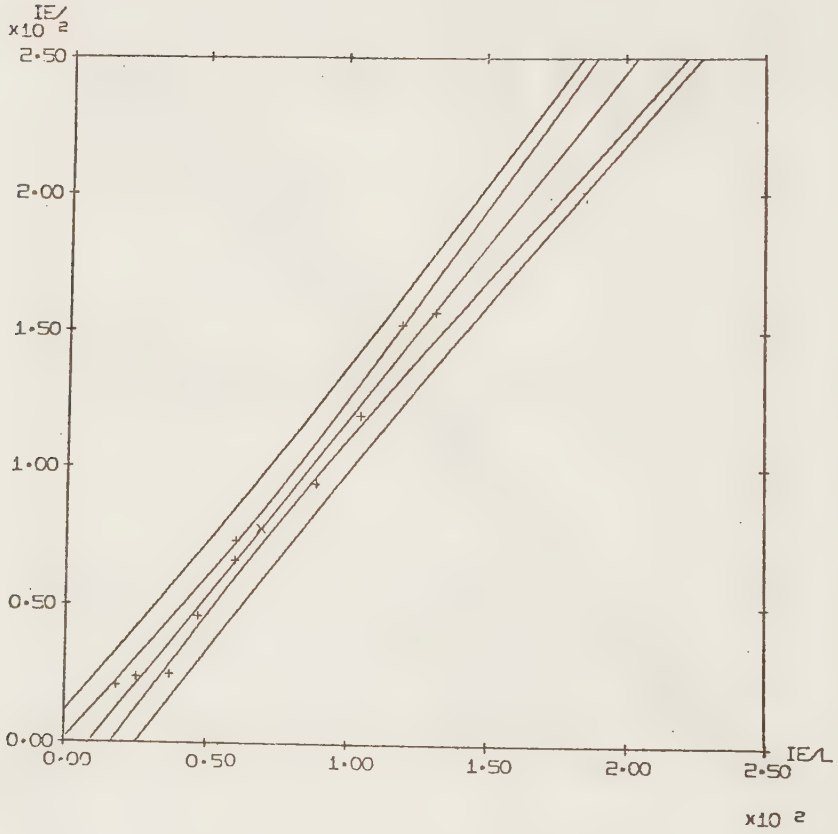


Abbildung 10:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Serum-Reagenz-Verhältnis 0,1:2,0, Netzmittel ARW 7
N=10, Y=ABX, A=-9,1, B=1,3+-0,06, R=0,990+-0,05

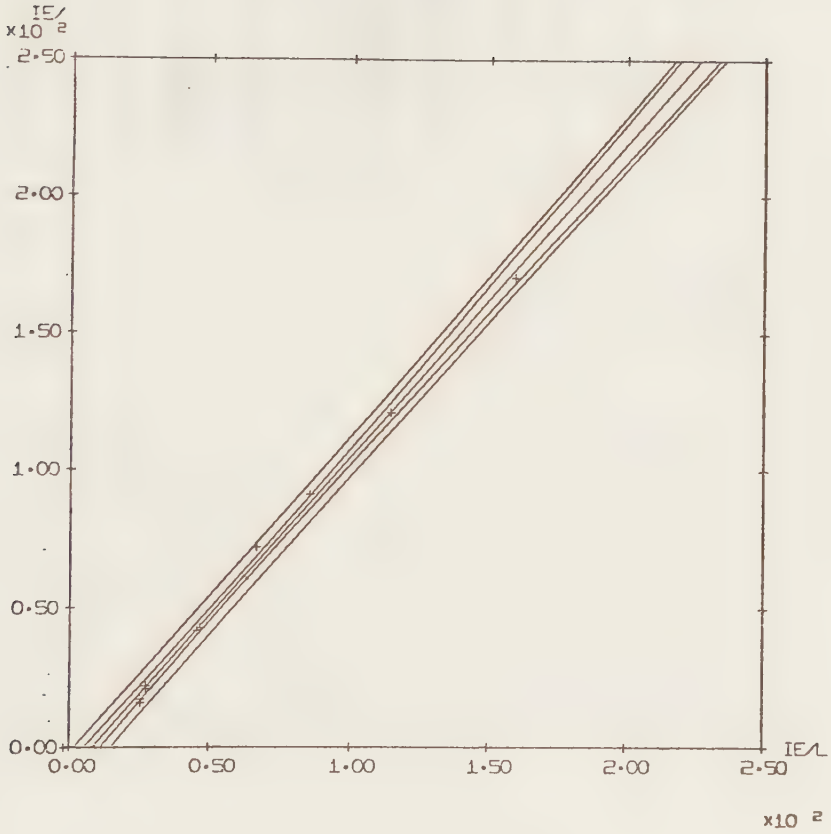


Abbildung 11:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Serum-Reagenz-Verhältnis 0,1:2,0, Netzmittel Octanol
N=10, Y=AßBX, A=-9,5, B=1,1+-0,02, R=0,998+-0,02

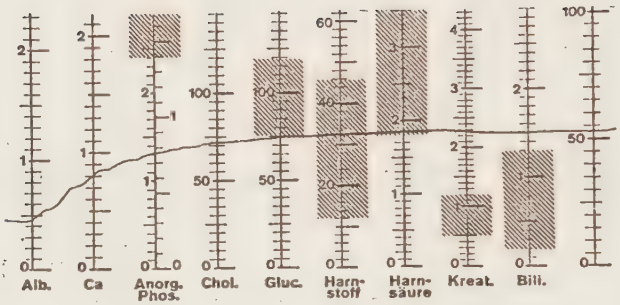


Abbildung 12:

Geradlinig verlaufendes Plateau mit Netzmittel Triton X-405

Mit dem Netzmittel Octanol erzielten wir eine vergleichbare Korrelation zwischen der manuellen und vollmechanisierten Methode mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}998 \pm 0{,}02$ (siehe Abbildung 11). Die Leerwertkonstanz entsprach aber wie bei den übrigen Detergentien nicht unseren Anforderungen. Die Plateaus zeigten ansteigende oder fallende Tendenzen, verliefen unruhig, ähnlich wie bei Verwendung von Plastikschläuchen anstatt Glas (siehe Seite 13), und es zeigte sich eine ausgesprochene Schleppneigung.

Zur Frage der Beeinflussung der Reaktion durch das von uns gewählte Detergens Triton X-405 bestimmten wir die GT in Patientenseren einmal mit der Routinehandmethode, ein zweites Mal mit der Routinehandmethode, wobei wir aber der Reagenzlösung 0,4 % Triton X-405 zusetzten. Es fanden sich keine nennenswerten Abweichungen, der Korrelationskoeffizienz betrug 0,996 ± 0,02 (siehe Abbildung 13).

Das Detergens Triton X-405 beeinflußt die Reaktion nicht nachteilig.

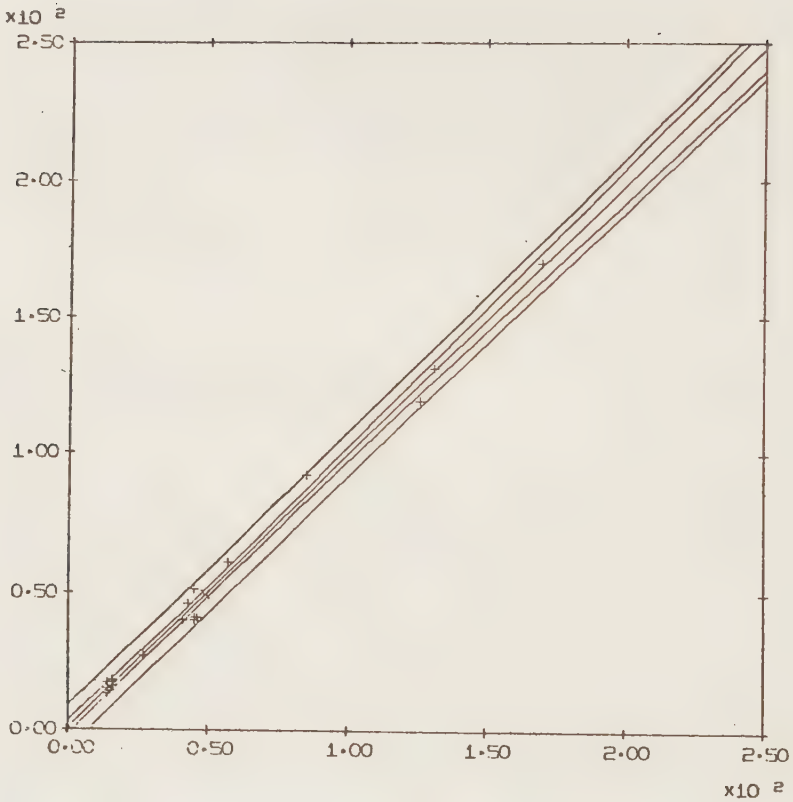


Abbildung 13:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode ohne Netzmittel, Y-Achse Routinemethode mit Netzmittel Triton X-405

N=20, Y=A+BX, A=0,76, B=0,99+-0,02, R=0,996+-0,02

2.2.2.12. Verhältnis Reagenz-Serum

Bei den ersten Versuchsreihen am SMA 12/60 benützten wir dasselbe Reagenz-Serum-Verhältnis wie bei der Routinehandmethode.

Reagenzlösung: Serumprobe 2 ml/min : 0,05 ml/min entsprechend 40:1.

Es trat dabei folgendes eigenartige Phänomen auf: Gegenüber der Routinehandmethode erwiesen sich die höheren (>100 IE) GT-Aktivitäten, am SMA 12/60 gemessen, als zu hoch, die niederen als zu niedrig. Netzmittelwechsel und Temperaturänderung brachten keine Linearität. Erst eine Änderung des Reagenz-Serum-Verhältnisses zugunsten der Serumproben erbrachte eine Lösung. Nach schrittweiser Reduzierung der Reagenzlösung erreichten wir die optimale Korrelation zur Handmethode bei einem Verhältnis 1,2 ml/min Reagenzlösung zu 0,1 ml/min Serum, entsprechend 12:1.

Der Korrelationskoeffizient betrug bei diesem Serum-Reagenz-Verhältnis 0,989 $\pm$ 0,008.

Die Diskrepanz zwischen hohen und niederen Werten fand sich bei diesem Reagenz-Serum-Verhältnis nicht mehr. Siehe Abbildungen 14, 15 und 16.

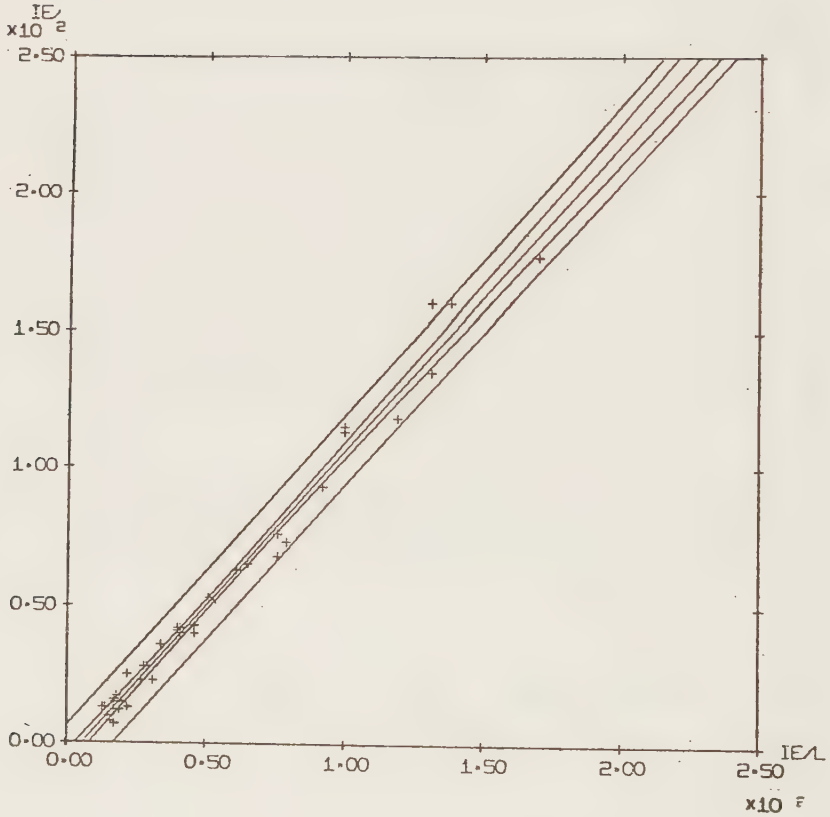


Abbildung 14:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Netzmittel Triton X-405,
Serum-Reagenz-Verhältnis 1:20
N=39, Y=A+BX, A=-6,4, B=1,1+-0,02, R=0,992+-0,02

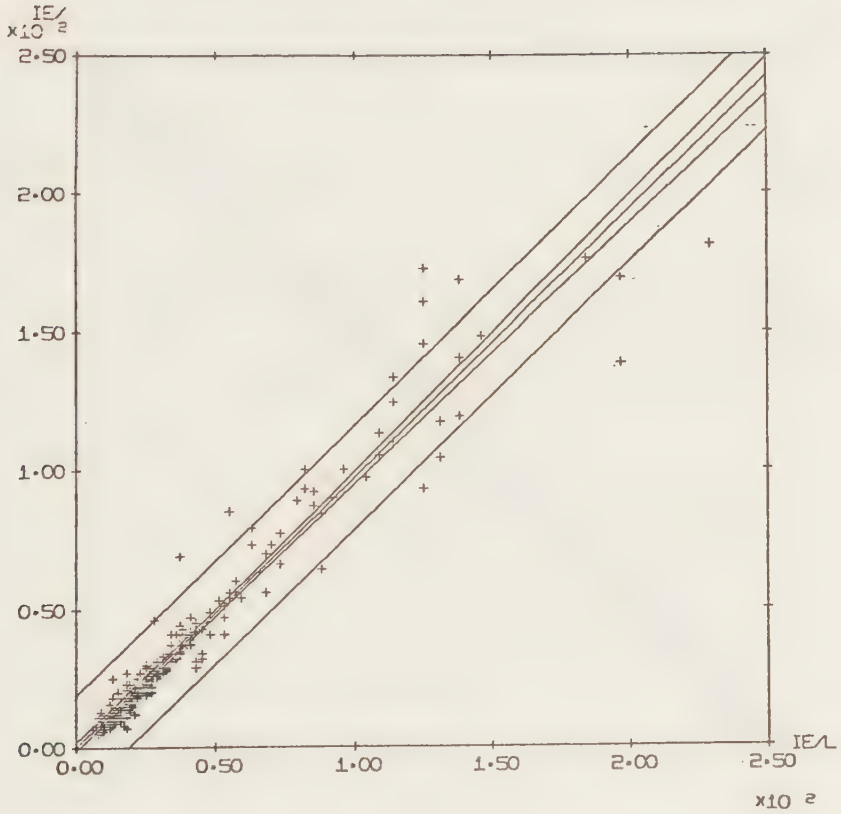


Abbildung 15:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Netzmittel Triton X-405,
Serum-Reagenz-Verhältnis 1:14
N=224, Y=A+BX, A=0,431, B=0,967+-0,015, R=0,969+-0,015

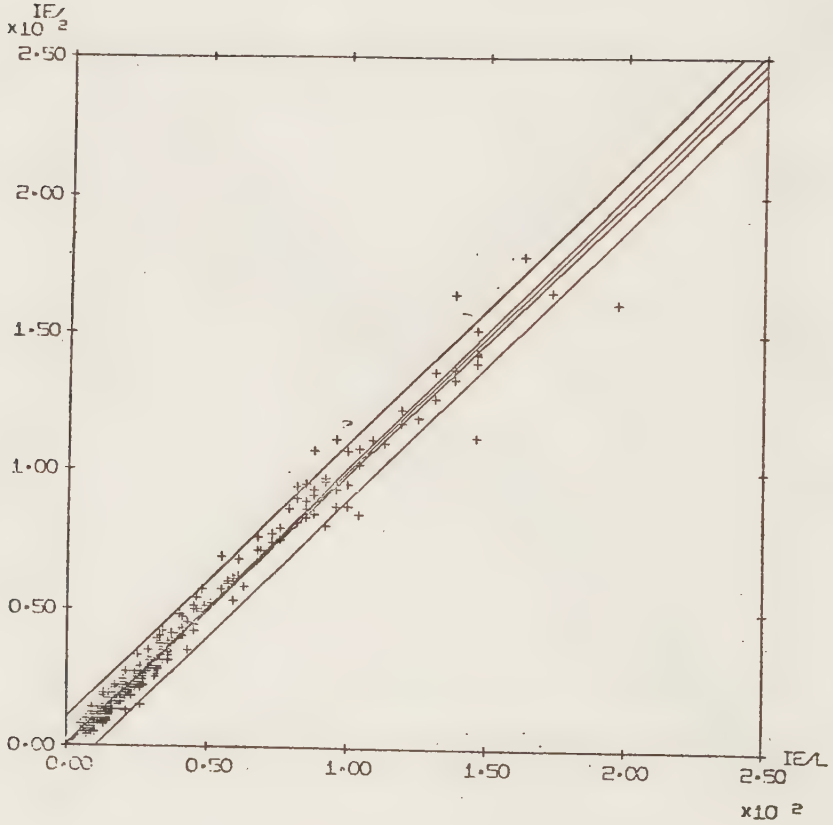


Abbildung 16:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Netzmittel Triton X-405,
Serum-Reagenz-Verhältnis 1:12
N=312, Y=A+BX, A=0,189, B=0,991+-0,01, R=0,989+-0,008

2.2.2.13. Identität der beiden Kanäle

Bei Bestimmungen am SMA 12/60 ist ein besonderes Augenmerk auf die Identität des Haupt- und Leerwertkanals zu richten.

Bei unserer Methode traten hinsichtlich der Identität an folgenden Einheiten Schwierigkeiten auf:
Heizbäder, Glasschlangen, Küvetten, Filter und Fotozellen.

a. Heizbäder:
Die Endtemperatur muß in beiden Kanälen gleich sein, da die Extinktion per se und das Reaktionsgeschehen temperaturabhängig wird.

b. Glasschlangen:
Sie müssen in beiden Kanälen hinsichtlich der Durchlaufzeit identisch sein, damit das Phasing beider Kanäle gelingt. Die Forderung, Kunststoffschläuche durch Glas zu ersetzen, bezieht sich auf den Hauptkanal (siehe Seite 13).

c. Küvetten:
Der Lichtweg durch beide Kanäle muß gleich sein, es muß also auf beiden Kanälen eine identische Leerwertabsorption registriert werden.

d. Filter:
Die optische Identität der Filter muß entsprechend Punkt c gewährleistet sein.

e. Fotozellen:
Entsprechend Punkt c und d.

3. ERGEBNISSE

Vergleichsmessungen

Nachdem wir die Bedingungen für eine Übertragung der Methode auf den SMA 12/60 erarbeitet hatten, verglichen wir mit der Handmethode und dem SMA 12/60 bestimmte Enzymaktivitäten:

1. In 312 Seren, die im Routinebetrieb anfielen;
2. Die Präzision in der Serie für 32 Seren am SMA 12/60 und von 21 Seren für die Routinemethode;
3. Die Präzision in der unterbrochenen Serie an 56 Seren im SMA 12/60 und an 25 Seren für die Routinemethode (Präzision von Tag zu Tag);
4. Die Linearität der Enzymaktivitätsmessung anhand von 2 Verdünnungsreihen.

ad 1.: Vergleich zwischen manueller und vollmechanisierter Serum-Enzym-Aktivitätsmessung

Während einer Woche verglichen wir 312 Seren, deren Gamma-GT-Aktivität mit der Routinehandmethode und der automatischen Bestimmung am SMA 12/60 gemessen wurde:

Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Abbildung 17 zusammengefaßt.
Die statistische Auswertung ergibt eine enge Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}989 \pm 0{,}008$.

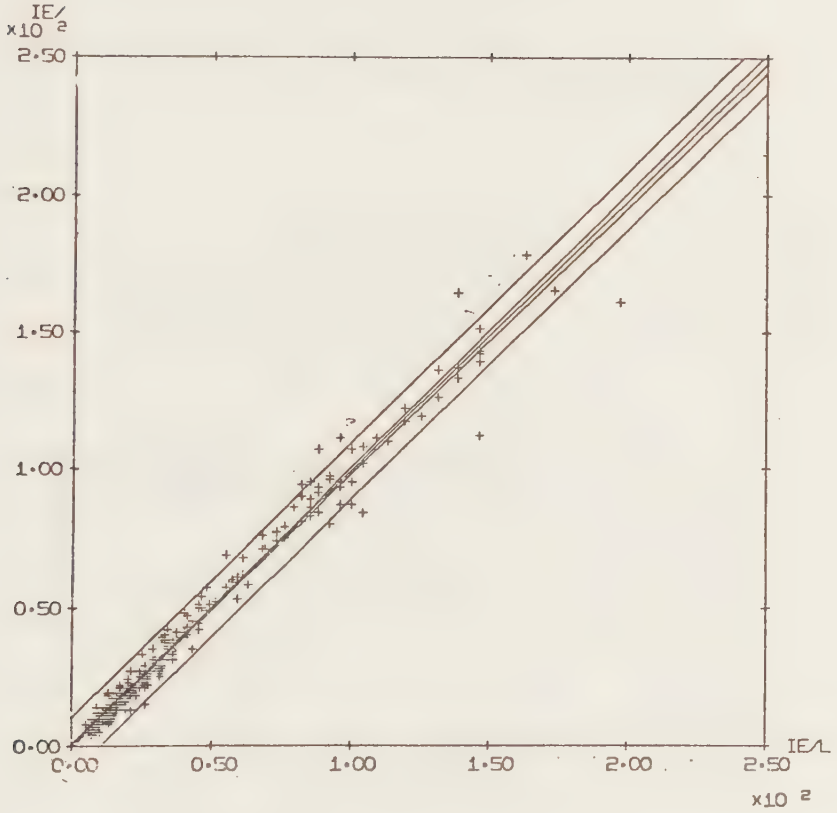


Abbildung 17:

Gamma-GT Korrelation: X-Achse Routinemethode,
Y-Achse SMA 12/60, Temperatur 37° C,
Netzmittel Triton X-405,
Serum-Reagenz-Verhältnis 1:12,
312 unausgewählte Seren stationärer Patienten
N=312, Y=A+BX, A=0,189, B=0,991+-0,01, R=0,989+-0,008

ad 2.: Präzision in der Serie

Der Vergleich der Präzision in der Serie zwischen Routinehandmethode und SMA 12/60 wurde mit verschiedenen Poolseren durchgeführt. Bei der Routinehandmethode erfolgte zur Präzisionskontrolle die Messung von fünf gleichen Seren. Im vollmechanisierten System wurden Proben eines Poolserums mit bekannter GT-Aktivität hintereinander gemessen.
Siehe Tabelle 1.

	N	Mittelw. IE/l	Standardabw. IE/l	Variations-koeff.
Routine-handmethode	21	24,38	1,83	7,50
SMA12/60	32	24,72	0,77	3,12

Tabelle 1:

Präzision in der Serie:
Vergleich der manuellen mit der automatisierten Methode

ad 3.: Präzision in der unterbrochenen Serie

Auch hier wurden Poolseren verwandt. Bei der Routinehandmethode wurde jedes sechste Serum gemessen, am SMA 12/60 jedes zehnte bis zwölfte.
Siehe Tabelle 2.

	N	Mittelw. IE/l	Standardabw. IE/l	Variations-koeff.
Routine-handmethode	25	13,08	0,86	6,59
SMA12/60	56	23,96	0,83	3,46

Tabelle 2:
Präzision in der unterbrochenen Serie:
Vergleich der manuellen mit der
automatisierten Methode

Durch Prüfung der Varianzen im F-Test ergab sich für die Präzision in der Serie für beide Methoden ein signifikanter Unterschied. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei $p = < 0,01$. Die Streuung ist bei der automatischen Methode mit $s = 0,77$ signifikant niedriger als bei der manuellen. Bei der Präzision in der unterbrochenen Serie ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden.

Die Signifikanz im ersten Fall führen wir darauf zurück, daß bei Seren mit relativ niederen Werten und etwa gleichen Enzymaktivitäten die einzelnen Meßpunkte bei der manuellen Methode zu eng beieinanderliegen, um ein genaues Ablesen zu gewährleisten (siehe Abbildung 18). Dies ist zweifellos ein Umstand, der gegen die manuelle Methode spricht.

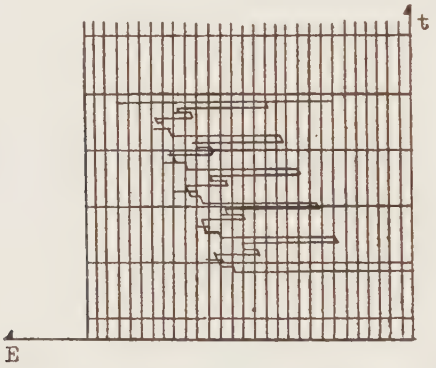


Abbildung 18:

Schreiberbild eines Eppendorf-Photometers während der manuellen Gamma-GT-Bestimmung; ein Testserum und fünf Serumproben
E = Extinktion
t = Papiergeschwindigkeit, 0,6 cm/min

ad 4.: Zur Linearität der Enzymaktivitätsmessung, gemessen an Verdünnungsreihen

Beim Vergleich von Seren mit hohen und niederen Gamma-GT-Aktivitäten und daraus angesetzten Verdünnungsreihen, fanden sich zwischen der Routinehandmethode und dem SMA 12/60 keine wesentlichen Abweichungen (siehe Abbildung 19).

Abweichend von SZASZ (16) war das Verhältnis zwischen den Aktivitäten und der Serumkonzentration nicht konstant. Mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnte Seren zeigten bei beiden Methoden konstand höhere Aktivitäten. SZASZ beschreibt ein ähnliches Phänomen bei der CK (18). Wir führen diese Erhöhungen auf veränderte Inhibitoreigenschaften bei Verdünnungen zurück.

Am SMA 12/60 können Enzymaktivitäten bis zu 175 IE/l gemessen werden, bei höheren Aktivitäten ist die nötige Genauigkeit nicht mehr gewährleistet, da dann die Spreizung der Skala auf dem Registrierpapier nicht mehr groß genug ist.

Unter 1378 GT-Bestimmungen, die mit der manuellen Routinemethode innerhalb von zwei Monaten durchgeführt wurden, fanden sich 73 Seren mit Aktivitäten über 175 IE/l, was einem Anteil von 5,3 % entspricht. Proben mit Aktivitäten über 175 IE/l werden verdünnt analysiert. Seren, die im Verhältnis 1:2 mit Aqua bidest. verdünnt wurden, zeigten im Schnitt um etwa 13 % höhere Aktivitäten, entsprechend der manuellen Methode.

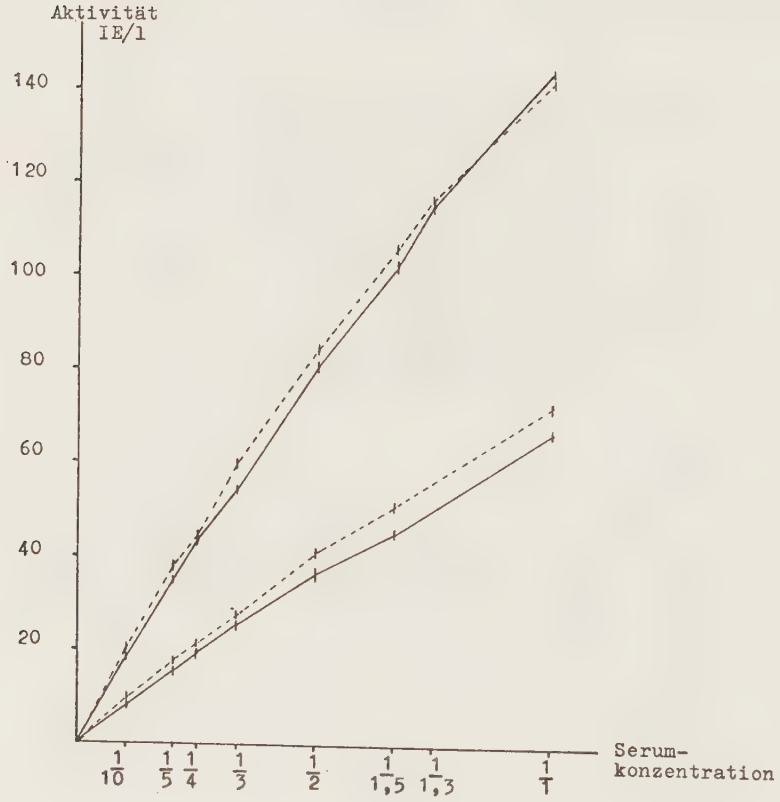


Abbildung 19:

Vergleich der Gamma-GT-Konzentration mit der Serumkonzentration
SMA 12/60, Routinemethode

4. DISKUSSION

Die hier beschriebene Methode zur Bestimmung der GT-Aktivität gestattet mit dem Gerät SMA 12/60 bei geringem personellem und zeitlichem Aufwand eine zusätzliche Laboruntersuchung. Sie ist als Screening-Test auf hepatobiliäre Erkrankungen von unbestrittenem Wert (1, 3, 9, 14). Darüber hinaus wird die Gamma-GT sowohl zur Verlaufsbeobachtung als auch zur differentialdiagnostischen Abklärung herangezogen (1, 10, 11, 21). SZASZ et al. (15) geben bei 249 Patienten mit zum Teil erhöhter AP, bei normaler LAP bzw. erhöhter LAP und normaler AP keinen Fall an, bei dem die Gamma-GT nicht auch erhöht war. Weiterhin fanden diese Autoren bei 264 Patienten mit hepato-biliären Erkrankungen, bei denen zugleich AP, LAP und die Transaminasen bestimmt wurden, die Gamma-GT als einziges Enzym, welches konstant erhöht war, und zwar von Beginn der Erkrankung an (15).

Bei der manuellen Methode handelt es sich um ein kontinuierliches Meßverfahren, beim SMA 12/60 um ein diskontinuierliches. Die Vorteile einer kontinuierlichen Registrierung der Enzymkinetik - es werden in unserem Fall sechs Meßpunkte bestimmt - gegenüber einem Verfahren mit Zwei-Punkt-Messung - es wird hier nur ein Meßpunkt nach einem bestimmten Zeitintervall im Vergleich zum Nullwert bestimmt - liegen auf der Hand. Ein Meßfehler, z.B. durch unzureichende Durchmischung des Serums mit der Reagenzlösung bedingt, wird sich beim kontinuierlichen Registrieren durch einen bogenförmigen Verlauf der Verbindungslinien zwischen den einzelnen Meßpunkten zeigen, folglich wäre ein genaues Ablesen des Anstiegswinkels nicht möglich. Beim diskontinuierlichen Meßverfahren würde dieser Fehler verborgen bleiben, da nur eine Messung zu einer bestimmten Zeit erfolgt. Wir möchten aber gleichzeitig auf die Ergebnisse auf Seite 29 hinweisen, wo wir bei Seren mit niederer Aktivität in der Serie signifikant bessere

Ergebnisse am SMA 12/60 gegenüber der manuellen Methode hatten.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist lediglich bei normalen Gamma-GT-Aktivitäten am SMA 12/60 besser, was auf ungenaues Ablesen der einzelnen Meßpunkte - bedingt durch Überlagerung - bei der manuellen Methode zurückzuführen sein dürfte (siehe Seite 30). Ansonsten fanden sich keine signifikant besseren Ergebnisse am SMA 12/60.

Als Normalwerte geben SZASZ et al. (16) für Frauen 3,2 - 13,5 IE und für Männer 4,5 - 24,8 IE an. Entsprechende Werte findet man bei HAESEN et al. (7). An unserer Klinik lagen die Normalwerte für Frauen zwischen 2 und 22 IE, für Männer zwischen 3 und 28 IE (Normalwerttabelle der medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Stand 01. 02. 1970).

In unserem Patientengut fanden sich etwa 5 % Gamma-GT-Aktivitäten, die über 175 IE/l lagen. Diese 5 % der Seren müssen für eine Untersuchung am SMA 12/60 entsprechend mit destilliertem Wasser verdünnt werden, da die Ableseskala am Gerät nur bis 175 IE/l reicht. Gegenüber der manuellen Methode ist dies aber kein Nachteil, da dort schon bei Aktivitäten um 130 IE/l verdünnt werden sollte, weil das Ablesen des flachen Anstiegswinkels zu ungenau wird.

Bis zur Hälfte aller Untersuchungen am SMA 12/60 in unserer Klinik fallen von ambulanten Patienten an. Eine routinemäßige Transaminasenbestimmung, wie vielfach geübt, könnte sich zunächst erübrigen, wenn zusätzlich zur Gamma-GT das Bilirubin am SMA 12/60 mitbestimmt würde. Auf eine routinemäßige Bestimmung der AP und LAP könnte des weiteren verzichtet werden.

Aufgrund der von uns erarbeiteten Ergebnisse kommen wir zu dem Schluß, daß es sich bei der Gamma-GT-Bestimmung am SMA 12/60 um ein neues automatisches Verfahren handelt, das, aufgrund zusätzlicher laborchemischer Ergebnisse, die der SMA 12/60 simultan liefert, eine echte Alternative zu der automatischen Bestimmung der Gamma-GT auf der Eppendorf-Straße darstellt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine vollmechanisierte Methode zur Bestimmung der Gamma-Glutamyltransferase (Gamma-GT) mit Hilfe des Technicon-Auto-Analyzer SMA 12/60 beschrieben. Das Substrat Gamma-Glutamyl-para-nitroanilid wird mit Glycylglycin in Tris-Puffer gelöst. Bei Zugabe von Serum findet eine enzymatisch katalysierte Reaktion statt, wobei para-Nitroanilin frei wird, das gemessen wird. Es wird der apparative Aufbau beschrieben, der für diese Enzymaktivitätsmessung erforderlich ist. Dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

a. Sämtliches Schlauchmaterial muß, soweit als möglich, durch Glas ersetzt werden.

b. Sieben verschiedene Netzmittel wurden getestet, wobei Triton X-405 am besten abgeschnitten hat.

c. Ausführlich wird auf das Verhältnis Reagenzlösung / Serum eingegangen, wobei eine Verschiebung zugunsten der Serumprobe nötig wurde.

Manuelle Aktivitätsmessungen wurden mit den Ergebnissen der "automatisierten" Methode verglichen. Der Vergleich wurde an 312 Seren durchgeführt, der Korrelationskoeffizient betrug hierbei 0,989 $\pm$ 0,008.
Bei der Untersuchung der Präzision in der Serie wurden signifikant bessere Ergebnisse am SMA 12/60 erzielt, bei einem Variationskoeffizienten von 3,1 % gegenüber 7,5 %. Bei der Präzision der unterbrochenen Serie war zwischen den beiden Methoden kein signifikanter Unterschied festzustellen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 ARONSON, K.F., HANSON, A., NOSSLIN, B.:
The Value of Gamma-glutamyl-Transpeptidase in Differentiating Viral Hepatitis from Obstructive Jaundice.
Acta Chir. Scand. 130, 92-99, 1965

2 DELBRUCK, A.:
Gamma-GT: Methodik und klinische Aspekte.
Diagnostik 8, 433-437, 1975

3 EGGSTEIN, M., LUDWIG, U.:
Fortschritte in der klinisch-chemischen Diagnostik von Leberkreankheiten.
Therapiewoche Heft 34/1971, 2314-2319

4 GIBINSKI, K., SZATON, R., MARASZEK, J.:
Evaluation of Gamma-glutamyl-Transpeptidase (GGTP) and Leuzinaminopeptidase (LAP).
Determinations in Internal Diseases.
Gastroenterologia 99, 237-246, 1963

5 GOLDBARG, J.A., FRIEDMAN, O.M., PINEDA, E.P., SMITH, E.E., CHATTERIJ, R., STEIN, E.H., RUTENBERG, A.M.:
The Colorimetric Determination of Gamma-glutamyl-Transpeptidase with a Synthetic Substrate.
Archives of Biochemistry and Biophysics 91, 61-70, 1960

6 GREENBERG, E.E., WOLLAEGER, G.A., FLEISHER, G.A., ENGSTROM, G.W.:
Demonstration of Gamma-Glutamyl-Transpeptidas Activity in Human Jejunal Mucosa.
Clin. Chim. Acta, 16 (1), 79-89, 1966

7 HAESEN, J.P., BERENDS, G.T., ZONDAG, H.A.:
An Automated Method for the Determination of Serum Gamma-Glutamyl-Transpeptidase.
Clin. Chim. Acta, 37, 463-470, 1972

8 HANES, C.S., HIRD, F.R.S. and F.J.R., ISHERWOOD, F.A.:
Synthesis of Peptides in Enzymic Reactions involving Gluthadione.
Nature 166, 288-292, 1950

9 KOKOT, F., KUSKA, J., MARASZEK, J.:
Die Bedeutung der Gamma-Glutamyl-Transpeptidase in der klinischen Diagnostik.
Zschr. inn. Med. 18, 851-856, 1963

10 KOMMERELL, B.:
Leberdiagnostik.
Diagnostik 8, 293-297, 1975

11 LUKASIK, S., RICHTERICH, R., COLOMBO, J.-P.:
Der diagnostische Wert der Alkalischen Phosphatase der Leucinaminopeptidase und der Gamma-Glutamyl-Transpeptidase bei Erkrankungen der Gallenwege.
Schweiz. med. Wschr. 98, 81-83, 1968

12 NAFTALIN, L., SEXTON, M., WHITAKER, J.F., TRACEY, D.:
A Routine Procedure for Estimating Serum Gamma-glutamyl-Transpeptidase Activity.
Clin. Chim. Acta, 26, 293-296, 1969

13 ORLOWSKI, M., MEISTER, A.:
Gamma-Glutamyl-p-nitroanilide: A new convenient Substrate for Determination and Study of L- and D-Gamma-Glutamyl-Transpeptidase Activities.
Biochim. Biophys. Acta, 73, 679-681, 1963

14 RUTENBERG, A.?., GOLDBARG, J.A., PINEDA, E.P.:
Serum Gamma-Glutamyl-Transpeptidase Activity in Hepatobiliary Pancreatic Disease.
Gastroenterology, 45 (1), 43-48, 1963

15 SZASZ, G., ROSENTHAL, P., FRITZSCHE, W.:
Die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität im Serum bei hepatobiliären Erkrankungen.
Dtsch. med. Wschr. 94, 1911-1917, 1969

16 SZASZ, G.:
A Kinetic Photometric Method for Serum Gamma-glutamyl-Transpeptidase.
Clinical Chemistry Vol. 15, No. 2, 124-136, 1969

17 SZASZ, G.:
Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, in:
"Methoden der Enzymatischen Analyse" von HANS ULRICH BERGMEYER, Band 1, 3. Auflage, 1974,
S. 757-762, Verlag: Chemie Weinheim

18 SZASZ, G., BUSCH, E.-W., FAROHS, H.-B.:
Serum-Kreatinkinase.
Dtsch. med. Wschr. 95, 829-835, 1970

19 SZCZEKLIK, E., ORLOWSKI, M., SZEWCZUK, A.:
Serum Gamma-Glutamyl-Transpeptidase Activity in Liver Disease.
Gastroenterology, 41, 353-359, 1961

20 SZEWCZUK, A., BARANOWSKI, T.:
Purification and Properities of Gamma-Glutamyl-Transpeptidase from Beef Kidney.
Biochemische Zeitschrift 338, 317-329, 1963

21 VILLA, L., DIOGUARDI, N., AGOSTONI, A., IDEO, G., STABILINI, R.:
Prognostic Value of Serum Gamma-Glutamyl-Transpeptidase Activity in Liver Disease.
Enzm. biol. clin. 7, 109-114, 1966

LEBENSLAUF

Am 30. Oktober 1947 wurde ich, Karl Friedrich Baur, als Sohn des Anton Baur und seiner Frau Thea, geb. Rudhard, in Friedrichshafen geboren.

Zwischen 1954 und 1967 besuchte ich in Friedrichshafen die Grundschule und das Gymnasium. Das Abitur legte ich am 18.10.1966 ab.

Ab Herbst 1967 begann ich zunächst in München, dann in Tübingen Chemie zu studieren.

Nach Erlangen eines Studienplatzes 1968 erfolgte das Studium der Medizin, das ich am 1.2.1974 mit dem Staatsexamen an der Universität Tübingen abschloß.

Meine Approbation als Arzt erhielt ich im Mai 1975.